

Meckthila Luise Hejn

1960

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

Direktor: Professor Dr. Kliewe

DER EINFLUSS VON ZUCKERN,
PURINEN UND VON PYRIMIDINEN AUF DEN RESISTENZGRAD (PC-RESISTENZ)
VON M. PYOGENES VAR. AUREUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
MECHTHILD LUISE HEYN
Sondershausen/Thüringen

Mainz, 25.5.1960



Dekan: Professor Dr. Dr. M. Herrmann

Referent: Professor Dr. Dr. G. Gillissen

Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe

Tag der mündlichen Prüfung: 25.5.1960

Datum des Diploms 25. MAI 1960

I N H A L T

	Seite
I. Einleitung und Inhalt der Arbeit	1
II. Die Phosphataseaktivität von <i>M. pyogenes</i> var. <i>aureus</i> in Beziehung zum Grad der Pc-Resistenz	2
III. Zur Problematik der Resistenz-Transformation	3
Eigene Versuche	
IV. Versuche zur Beeinflussung der Phosphataseaktivität von <i>M. pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	5
a) Versuchsanordnung	5
b) Besprechung der Ergebnisse	7
V. Beeinflussung des Resistenzgrades durch Zugabe verschiedener Zucker, Purine und Pyrimidine	22
a) Versuchsanordnung	22
b) Besprechung der Ergebnisse	25
VI. Diskussion	44
VII. Zusammenfassung	46
VIII. Literatur	47

I. EINLEITUNG UND INHALT DER ARBEIT

Bekannt ist die Abhängigkeit des Resistenzgrades einer Keimpopulation gegen Penicillin von der Zusammensetzung des Testmediums, von der Impfzahl und von der H-Ionenkonzentration des Mediums. Zur Bedeutung der Impfzahl muß allerdings einschränkend gesagt werden, daß diese bei Nichtpenicillinasebildnern in weiten Grenzen ohne nennenswerte Beeinflussung des Testergebnisses schwanken kann im Gegensatz zu Penicillinasebildnern. Diese Beobachtungen legen den Wunsch nach einer näheren Definition milieubedingter Einflußfaktoren nahe.

Die neuere Forschung auf dem Gebiet der Chemoresistenz von Mikroorganismen brachte das genetisch sehr wichtige Resultat, daß der hereditäre Faktor Chemoresistenz mit der aus resistenten Zellen isolierten Desoxyribonucleinsäure (DNS) künstlich auf sensible Zellen übertragen werden kann. Solche Transformationserscheinungen wurden nicht nur beobachtet am Modell der Chemoresistenz, sondern auch mit vielen anderen, z.B. serologischen Eigenschaften von Bakterienzellen. Die transformierende Aktivität einer DNS-Transformation wird durch fermentative Hydrolyse oder Säurehydrolyse aufgehoben. Diese Versuche mit hochpolymeren DNS-Präparationen sprachen für eine Spezifität der an die Struktur der DNS gebundenen Eigenschaften. In Erweiterung dieser Vorstellungen konnte vornehmlich am hiesigen Institut gezeigt werden, daß auch nichtspezifische DNS-Präparationen, d.h. also solche aus chemosensiblen Zellen in der Lage sind, den resistenten Anteil einer Staphylokokkenpopulation eindeutig zu erhöhen, allerdings quantitativ nicht in demselben Ausmaß wie die DNS aus resistenten Zellen. Es handelt sich also hierbei zweifellos um ein paraspezifisches Phänomen, das ebenfalls durch DN-ase aufgehoben werden kann. Aus diesen Beobachtungen zusammengekommen ergibt sich die Frage, ob Purine und Pyrimidine sowie Pentosen im Verhältnis zu Dextrose u. U. einen Anstieg des mittleren Resistenzgrades einer Keimpopulation bzw. eine Zunahme des resistenten Anteils einer solchen Population bewirken.

Da ferner bekannt ist, daß bei zunehmender Pc_4 -Resistenz von Staphylokokken - korrelationsstatistisch gesichert - die Phosphataseaktivität zunimmt, sollte gleichzeitig untersucht werden, ob durch die genannten Stoffe sich eine erhöhte Phosphataseaktivität nachweisen läßt.

II. DIE PHOSPHATASEAKTIVITÄT VON *M. PYOGENES* VAR. *AUREUS* IN BEZIEHUNG ZUM GRAD DER PC-RESISTENZ

Nach den Untersuchungen von Dufrenoy und Pratt sollen kleine Pc-Konzentrationen im Gegensatz zu hohen die alkalische Phosphatase von *M. pyogenes* var. *aureus* hemmen. Bei den Versuchen dieser Autoren handelte es sich um qualitative Bestimmungen. Die Untersuchung der Beeinflussung der Phosphatase von Staphylokokken durch Pc unter quantitativen Gesichtspunkten ergab, daß mit Colamin-Phenolphthaleinphosphat und mit p-Nitrophenyldinatriumphosphat als Substrat die Aktivität der alkalischen Phosphatase weder in über- noch in subbakteriostatischen Konzentrationen von Pc vermindert wird. Auch die saure Phosphatase des Pc-sensiblen Stammes wird nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird die saure Phosphatase des resistenten Stammes durch Pc sowohl in über- als auch in subbakteriostatischen Konzentrationen bei Verwendung von beiden Substanzen deutlich gehemmt (Gillissen und Ruda).

In Verbindung mit diesen Untersuchungen wurde die Frage ventiliert, ob der Resistenzgrad von Staphylokokken in Beziehung steht zur Phosphataseaktivität. Mit einer größeren Anzahl von verschiedenen Pc-resistenten Staphylokokkus-aureus-Stämmen konnte festgestellt werden, daß korrelationsstatistisch gesichert eine Abhängigkeit von Resistenzgrad und Phosphataseaktivität besteht. Mit zunehmendem Resistenzgrad nimmt auch die Phosphataseaktivität zu. Diese Aussage ist sowohl gültig für Staphylokokkus-aureus-Stämme, die keine Penicillinase bilden, deren Resistenz also in vitro angezüchtet wurde, als auch für Pcnase bildende - also aus pathologischem Material isolierte - Stämme (Gillissen und Ruda). Markov und Mitarbeiter beschrieben kurz danach, daß die mittlere Phosphataseaktivität von Pc-sensiblen Staph. aur.-Stämmen kleiner sei als die von resistenten Stämmen. Einschränkend wiesen diese Autoren aber darauf hin, daß sich diese Differenz statistisch nicht sichern ließe. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß gegen die Befunde dieser Autoren und deren Deutung erhebliche Einwände gemacht werden können (Gillissen). Bei diesen Untersuchungen wurde eine recht kleine Zahl von Staph.-Stämmen untersucht, so daß die Streuung natürlich besonders hoch ist. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse nicht korrelationsstatistisch ausgewertet, sondern lediglich durch einen einfachen Mittelwertsvergleich. Diese Art des Vergleichs ist insofern noch sehr bedenklich, da Stämme aus einem sehr engen, niederen Resistenzbereich mit solchen aus einem sehr weiten, höheren Resistenzbereich verglichen wurden. Eine korrelationsstatistische Kon-

trolle der Versuche von Markov und Mitarbeitern war nicht möglich, da eine Angabe der Einzeldaten fehlte.

III. ZUR PROBLEMATIK DER RESISTENZ-TRANSFORMATION

Griffith beobachtete schon 1928, daß der serologische Typ von Pneumokokken sich in spezifischer Weise änderte, wenn die Keime in Gegenwart eines zweiten durch Hitze getöteten Typs durch In-vivo-Passagen weitergezüchtet wurden. Diese Beobachtung läßt sich auch bei In-vitro-Versuchen bestätigen (Dawson und Sia). Ähnliche Beobachtungen konnten auch gemacht werden, wenn eine Chemoresistenz als Kriterium der Eigenschaft eines Stammes gewählt wurde. Eine eindeutige Aussage ließen die Versuche von Hotchkiss zu, bei denen es gelang, eine Streptomycinresistenz mittels DNS aus resistenten Pneumokokken auf sensible Zellen derselben Keimart zu übertragen. Die Bedeutung der DNS bei diesem Vorgang ist besonders aus der Aufhebung der DNS-Wirkung nach Beeinflussung durch DNase zu ersehen. Eine solche Übertragung von Erbeigenschaften durch das Kernmaterial einer Zelle wird als Transformation bezeichnet. Im Laufe der letzten acht Jahre wurden zahlreiche Versuche beschrieben, die diese ersten Beobachtungen bestätigen.

Nicht unwesentlich ist, daß eine transformierende DNS mit dem Faktor Chemoresistenz nur kurze Zeit ($1/2 - 15'$) auf einen sensiblen Stamm einzuwirken braucht, um eine Transformation auszulösen. Allerdings ist die Zahl der transformierten Zellen im Vergleich zur Gesamtpopulation verhältnismäßig klein.

Die oben beschriebene Art einer Transformation kann auch als eine intraspezifische Reaktion bezeichnet werden. Demgegenüber kennt man erst seit jüngerer Zeit auch eine interspezifische Reaktion (Alexander und Leidy). Das wesentlichste Kennzeichen der letztgenannten Transformationsart ist die gegenüber der intraspezifischen Transformation geringere Transformationsfrequenz (Schäffer). Die interspezifischen Reaktionen umfassen aber nicht nur Transformationen, sondern auch Hemmreaktionen gegenüber heterologen Rezeptorstämmen. Die wiederum heterospezifischen Transformationsfrequenzen sind nicht verursacht durch eine unterschiedliche Adsorption oder Penetration der DNS-Moleküle, da dieser Mechanismus nicht speziesspezifisch zu sein scheint (Schäffer 1957).

Möglicherweise handelt es sich auch bei folgender Beobachtung um einen Vor-

gang, der dem Begriff der interspezifischen Reaktion zuzuordnen ist: Während Pc-sensible Staph. nach Beeinflussung durch DNS aus resistenten Zellen ausgeprägte Transformationserscheinungen zeigen (aufhebbar durch Vorbehandlung der DNS durch DN-ase), gelingt es auch mit DNS aus dem homologen Pc-sensiblen Stamm nach Einwirkung auf denselben sensiblen Stamm Transformationserscheinungen aufzuweisen (Gillissen). Der Unterschied zwischen beiden Versuchen besteht lediglich im Ausmaß der Transformationsfrequenz, die im letzteren Falle bedeutend kleiner, wenn auch statistisch beweisend ist. Überdies läßt sich die homologe Transformation durch Vorbehandlung der DNS mit DN-ase aufheben. Danach ist die Frage naheliegend, ob es außer einem strukturbedingten spezifischen Gesichtspunkt noch einen rein quantitativen Faktor gibt, der für die Resistenzsteigerung eine Rolle spielt. Für eine solche Annahme könnte die Beobachtung sprechen, daß der resistente Anteil einer im ganzen Pc-sensiblen Population von Staph. aureus nach Beeinflussung durch kristalline DN-ase abnimmt (Gillissen).

In Verbindung mit dieser Fragestellung wurde deswegen untersucht, ob ein Angebot von Purinen und Pyrimidinen im Überschuß zu einer Erhöhung der Chemoresistenz von Pc-sensiblen Staph. -Stämmen führt bzw. zu einer Erhöhung des resistenten Anteils dieser Populationen, und ob eine Zunahme der Phosphataseaktivität zu beobachten ist. Außer den genannten Substanzen wurde ferner noch der mögliche Einfluß von Arabinose, einer Pentose, und im Vergleich dazu der von Dextrose und Saccharose untersucht.

EIGENE VERSUCHE

IV. VERSUCHE ZUR BEEINFLUSSUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT

VON M. PYOGENES VAR. AUREUS

a) Versuchsanordnung

Als Testkeime dienten Staph. aur. Sg 511 mit einer im Reihenverdünnungstest festgestellten mittleren Sensibilität von 0.04 E Pc/ml. Als Puffer wurden verwandt: Na-acetat-Eisessig-Puffer von pH 5, 6 und Glycocoli-Puffer von pH 12, 0.

Die Phosphatasebestimmung wurde durchgeführt mit p-Nitrophenyl-Dinatriumphosphat (NPP) mit einem Molekulargewicht von 262, 66.

Die Eichkurven wurden mit p-Nitrophenol gelegt. Verwandt wurde der Photometer Eppendorf, Küvetten mit einer Tiefe von 20 mm sowie ein Filter mit 405 nm.

NPP wurde in einer Lösung von 15, 23 Millimol benutzt.

Als Medium für die Testkeime dienten normale Nährbouillon ohne Zuckerzusatz sowie ein synthetisches Medium. Das letztere hatte folgende Zusammensetzung:

Casein hydrolysat "Bayer"	12.0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.3
K ₂ HPO ₄	0.5
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.1
2%ige CaCl ₂ -Lösung	10 ml
Aqua dest.	ad 1000.0

Diese Lösung wurde 30 Min. bei 121° C sterilisiert und filtriert.

Die Testkeime wurden von der Stammkultur in Bouillon bzw. synthetisches Nährmedium (Nä) eingepft und 16 Std. bei 37° C bebrütet. Von dieser Kultur wurden 0.1 ml auf 36 ml desselben Kulturmediums gegeben und 4 ml Aqua dest. von pH 7.0 mit den gewünschten Testsubstanzen dazugegeben. Die Lösung der Testsubstanzen war 30 Min. bei 121° C autoklaviert worden. (In der Kontrolle befand sich dasselbe Volumen Aqua dest. ohne Zusätze.) Diese Mischung wurde 16 Std. bei 37° C bebrütet und dann 20 Min. lang bei 600 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach Waschen mit Aqua dest. von pH 7.0 wurden die Keime wiederum mit Aqua dest. von pH 7.0 aufge-

nommen und nach mikroskopischer Keimzählung (3malige Beschickung einer Thomazählkammer und jedes Mal Auszählung von 5 großen Quadraten, Verwendung des Mittelwertes der nach jeder Beschickung ermittelten Keimkonzentration) die Keimkonzentration mit Aqua dest. von pH 7.0 auf 5×10^9 und 1×10^{10} Zellen/ml eingestellt. Während der Keimzählung wurde die Keimsuspension in Eiswasser zur Vermeidung weiterer Zellteilung aufbewahrt.

Alle Phosphatasebestimmungen wurden mit zwei verschiedenen Keimkonzentrationen (5×10^9 und 1×10^{10} Zellen/ml) durchgeführt.

Der Ansatz zur Bestimmung der sauren Phosphatase wurde wie folgt zusammengestellt:

- 1.5 ml NPP Lösung (in Aqua dest. von pH 5.6)
- + 1.0 ml Aqua dest. von pH 5.6 oder die verwandte Testsubstanz in Aqua dest. von pH 5.6
- + 1.0 ml Keimsuspension (pH 7.0)
- + 2.5 ml Puffer pH 5.6

Diese Mischung kam für 30 Min. ins Wasserbad bei 37°C . Zur Entwicklung der gelben Farbe wurde 0.5 ml NaOH bis zum Beginn einer Gelbfärbung dazugegeben und mit Puffer von pH 12.0 ergänzt (NaOH + Puffer = 4.5 ml). Mehrere pH-Kontrollen ergaben im ersten Ansatz pH 5.6 und im Ansatz zur Entwicklung der Farbe pH 12.0. Nach Zentrifugieren wurde die Lösung mit Filter 405 nm photometriert. Die Farbkonzentration wurde durch Übertragung der Extinktionswerte auf die Eichkurve in Mikrogramm p-Nitrophenol für die verwandte Keimzahl umgerechnet.

Die Versuche wurden also prinzipiell in der Weise angesetzt, daß die Keime vor der Zusammenstellung des Fermentansatzes 16 Std. lang in einem Medium mit Zusatz der Testsubstanzen gezüchtet (in der Arbeit als "Vorzüchtung" bezeichnet) und dann anschließend im Fermentansatz sowohl in Anwesenheit der Testsubstanzen in der gleichen Konzentration als auch in Abwesenheit dieser Testsubstanzen ausgetestet wurden. Zum Vergleich dafür dienten Keime, die in Abwesenheit der Testsubstanzen vorgezüchtet wurden, wobei die Fermentansätze dieselben wie oben beschrieben waren.

Unter Passagestämmen werden Keimpopulationen verstanden, die in mehreren Passagen von je 24 Std. in einem Medium mit den Testsubstanzen gezüchtet worden waren.

Die Testsubstanzen wurden mit folgenden Endkonzentrationen pro ml verwandt:

Arabinose	100 mg	Adenin	100 μ g
Arabinose	1 mg	Adenin	10 μ g
Arabinose	100 μ g	Uracil	100 μ g
Arabinose	10 μ g	Uracil	10 μ g
Dextrose	10 mg	Thymin	100 μ g
Dextrose	1 mg	Thymin	10 μ g
Dextrose	100 μ g	Cytosin	100 μ g
Saccharose	10 mg	Cytosin	10 μ g
Saccharose	1 mg		
Sachharose	100 μ g		
Arab. + Adenin	100 μ g + 10 μ g	Dextrose + Uracil	100 μ g + 10 μ g
Arab. + Adenin	100 μ g + 100 μ g	Dextrose + Uracil	100 μ g + 100 μ g
Arab. + Uracil	100 μ g + 10 μ g	Dextrose + Thymin	100 μ g + 10 μ g
Arab. + Uracil	100 μ g + 100 μ g	Dextrose + Thymin	100 μ g + 100 μ g
Arab. + Thymin	100 μ g + 10 μ g	Sacchar. + Adenin	100 μ g + 10 μ g
Arab. + Thymin	100 μ g + 100 μ g	Sacchar. + Adenin	100 μ g + 100 μ g
Arab. + Cytosin	100 μ g + 10 μ g	Sacchar. + Uracil	100 μ g + 10 μ g
Dextrose + Adenin	100 μ g + 10 μ g	Sacchar. + Uracil	100 μ g + 100 μ g
Dextrose + Adenin	100 μ g + 100 μ g	Sacchar. + Thymin	100 μ g + 10 μ g
		Sacchar. + Thymin	100 μ g + 100 μ g
		Sacchar. + Cytosin	100 μ g + 100 μ g

b) Besprechung der Ergebnisse (Saure Phosphatase)

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammengestellt, die unter Verwendung von synthetischem Nährmedium ohne Passagen erzielt wurden. Die Testsubstanzen fehlten in der Vorzüchtung (Kontrolle) und wurden im Versuch bei der Vorzüchtung zugesetzt. Die Austestung im Fermentansatz erfolgte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit dieser Testsubstanzen.

Aus Tabelle 1 scheint zunächst einmal hervorzugehen, daß die im doppelten Ansatz durchgeführten Versuche umgerechnet auf jeweils 10^{10} Keime Phosphatasewerte (μ g freigesetztes p-Nitrophenol) ergaben, die im allgemeinen sehr eng beieinander lagen bzw. zum Teil völlig identisch waren. Diese allgemeine Beobachtung spricht zunächst einmal für die Verwertbarkeit der Ergebnisse, und zwar dann, wenn - wie es zunächst der Aufgabe entsprach - ein größerer Überblick im Sinne einer Orientierung gegeben werden sollte. Diese vorläufige Wertung scheint insofern berechtigt zu sein, als es sich bei den Endresultaten

um Umrechnungswerte ausgehend von 2 Ansätzen mit verschiedener Zellzahl handelt.

Ferner fällt nach Tabelle 1 auf, daß die Werte der Leerkontrolle (Vorzüchtung der Keime in synthetischem Nährmedium ohne Zusatz von Testsubstanzen und Durchführung der fermentativen Substratspaltung ebenfalls in Abwesenheit dieser Stoffe) die niedrigsten Werte ergaben. Fast ausschließlich lagen die Werte für alle anderen Ansätze höher. Ausnahmen davon stellten die Versuche mit Arabinose (10 $\mu\text{g/ml}$) und Dextrose (1 mg/ml) sowie mit Cytosin (10 $\mu\text{g/ml}$) dar. Es wäre aber wahrscheinlich nicht richtig, diesem Befund eine zu große Bedeutung beizumessen, da diese Werte sich nicht in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz einordnen lassen.

Eine allgemeine Übersicht erweckt den Eindruck, als wären die Werte häufig dann etwas höher, wenn die Testsubstanzen im Fermentansatz vorhanden waren, jedoch ist eine Verallgemeinerung schwer möglich, zumal die Unterschiede nicht sehr ausgeprägt sind, so daß man annehmen könnte, daß der Unterschied in die normale Fehlerbreite fällt. Dies könnte praktisch nur unter statistischen Voraussetzungen geklärt werden.

Im Verhältnis zu den Versuchen mit Cytosin ergaben die mit Thymin, mit Dextrose, mit höherer Konzentration von Saccharose wesentlich höhere Werte. Mit Adenin erreicht man fast ähnlich hohe Werte.

Betrachtet man die Kombinationen zwischen verschiedenen Zuckern und Adenin, Uracil, Thymin, dann liegen diese Werte alle ziemlich hoch, gehen aber nicht über die mit den Einzelstoffen erzielten Werte hinaus.

TABELLE 1

Aktivität der sauren Phosphatase von *M. pyogenes* var. *aureus* unter Verwendung von synthetischem Nährmedium und verschiedenen Testsubstanzen (keine Passagen).

Anmerkung: + = neuer Ansatz

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff	Keimzahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Arabinose	10 mg	mit	10 5	13, 13 13, 13
Arabinose	10 mg	ohne	10 5	12, 60 13, 13
Arabinose	1 mg	mit	10 5	13, 13 14, 18
Arabinose	1 mg	ohne	10 5	12, 60 12, 60
Arabinose	100 μg	mit	10 5	16, 80 18, 90
+ Arabinose	100 μg	mit	10 5	17, 33 15, 23
Arabinose	100 μg	ohne	10 5	17, 33 19, 95
+ Arabinose	100 μg	ohne	10 5	17, 33 17, 33
Arabinose	10 μg	mit	10 5	9, 45 8, 92
Arabinose	10 μg	ohne	10 5	12, 08 12, 60
Adenin	100 μg	mit	10 5	13, 12 13, 65
Adenin	100 μg	ohne	10 5	13, 66 14, 18
Adenin	10 μg	mit	10 5	14, 18 14, 17
+ Adenin	10 μg	mit	10 5	13, 65 13, 65

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff	Keimzahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Adenin	10 μg	ohne	10	15, 75
			5	16, 28
+ Adenin	10 μg	ohne	10	13, 15
			5	13, 13
Uracil	100 μg	mit	10	17, 33
			5	16, 80
Uracil	100 μg	ohne	10	17, 33
			5	17, 33
Uracil	10 μg	mit	10	15, 23
			5	14, 70
Uracil	10 μg	mit	10	14, 70
			5	14, 18
Uracil	10 μg	ohne	10	13, 13
			5	12, 60
Uracil	10 μg	ohne	10	14, 12
			5	13, 60
Thymin	100 μg	mit	10	16, 80
			5	16, 80
Thymin	100 μg	ohne	10	13, 13
			5	13, 65
Thymin	10 μg	mit	10	15, 98
			5	15, 98
+ Thymin	10 μg	mit	10	15, 23
			5	15, 33
Thymin	10 μg	ohne	10	13, 13
			5	13, 13
+ Thymin	10 μg	ohne	10	14, 18
			5	14, 70
Thymin	1 μg	mit	10	15, 23
			5	15, 75
Thymin	1 μg	ohne	10	11, 55
			5	11, 02
Cytosin	100 μg	mit	10	11, 55
			5	11, 55
Cytosin	100 μg	ohne	10	11, 53
			5	11, 03

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff	Keimzahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Cytosin	10 μg	mit	10	11,03
			5	11,03
Cytosin	10 μg	ohne	10	10,50
			5	10,49
Dextrose	10 mg	mit	10	16,80
			5	18,38
Dextrose	10 mg	ohne	10	14,18
			5	13,13
Dextrose	1 mg	mit	10	12,60
			5	12,60
Dextrose	1 mg	ohne	10	10,50
			5	9,98
Dextrose	100 μg	mit	10	15,23
			5	15,98
+ Dextrose	100 μg	mit	10	18,38
			5	18,38
Dextrose	100 μg	ohne	10	16,80
			5	15,75
+ Dextrose	100 μg	ohne	10	16,80
			5	17,33
Saccharose	10 mg	mit	10	17,33
			5	17,33
Saccharose	10 mg	ohne	10	17,85
			5	18,38
Saccharose	1 mg	mit	10	14,70
			5	14,70
Saccharose	1 mg	ohne	10	13,13
			5	14,18
Saccharose	100 μg	mit	10	14,18
			5	13,13
+ Saccharose	100 μg	mit	10	14,70
			5	14,64
Saccharose	100 μg	ohne	10	13,13
			5	13,65
+ Saccharose	100 μg	ohne	10	13,10
			5	13,13

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl x 10 ⁹	µg pNph pro 10 ¹⁰ Zellen
Arab. + Adenin	100 µg+10 µg	mit	10	14, 18
			5	15, 23
Arab. + Adenin	100 µg+10 µg	ohne	10	13, 65
			5	13, 23
Arab. + Uracil	100 µg+10 µg	mit	10	16, 80
			5	15, 23
Arab. + Uracil	100 µg+10 µg	ohne	10	15, 23
			5	14, 18
Arab. + Thymin	100 µg+10 µg	mit	10	15, 75
			5	17, 33
Arab. + Thymin	100 µg+10 µg	ohne	10	14, 18
			5	13, 13
Arab. + Cytos.	100 µg+10 µg	mit	10	13, 11
			5	13, 13
Arab. + Cytos.	100 µg+10 µg	ohne	10	12, 60
			5	11, 55
Dextr. + Adenin	100 µg+10 µg	mit	10	13, 61
			5	13, 13
Dextr. + Adenin	100 µg+10 µg	ohne	10	13, 12
			5	12, 62
Dextr. + Uracil	100 µg+10 µg	mit	10	14, 75
			5	14, 18
Dextr. + Uracil	100 µg+10 µg	ohne	10	13, 13
			5	14, 18
Dextr. + Thymin	100 µg+10 µg	mit	10	13, 65
			5	14, 70
Dextr. + Thymin	100 µg+10 µg	ohne	10	14, 18
			5	13, 13
Dextr. + Cytosin	100 µg+10 µg	mit	10	13, 10
			5	13, 10
Dextr. + Cytosin	100 µg+10 µg	ohne	10	11, 57
			5	11, 55
Sacch. + Adenin	100 µg+10 µg	mit	10	13, 65
			5	14, 18
Sacch. + Adenin	100 µg+10 µg	ohne	10	13, 13
			5	13, 15

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Sacch. +Uracil	100 μg +10 μg	mit	10	18,38
			5	18,38
Sacch. +Uracil	100 μg +10 μg	ohne	10	17,33
			5	18,38
Sacch. +Thymin	100 μg +10 μg	mit	10	14,70
			5	13,10
Sacch. +Thymin	100 μg +10 μg	ohne	10	13,13
			5	13,13
Sacch. +Cytosin	100 μg +10 μg	mit	10	13,13
			5	14,18
Sacch. +Cytosin	100 μg +10 μg	ohne	10	12,08
			5	11,55
Nährmedium		ohne	10	11,55
			5	11,57
+ Nährmedium		ohne	10	9,98
			5	9,98

In Tabelle 2 ist die Aktivität der sauren Phosphatase von Staph. aureus unter Verwendung eines synthetischen Nährmediums wiedergegeben, wobei die Testkeime vor der Austestung über mehrere 24-Std. -Passagen in dem Medium mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen vorgezüchtet waren.

TABELLE 2

Aktivität der sauren Phosphatase von *M. pyogenes* var. *aureus* unter Verwendung von synthetischem Nährmedium und verschiedenen Testsubstanzen (Passagen)

Anmerkung: + = neuer Ansatz

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Zahl der Passag.	Ferment- ansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl $\times 10^9$	μg pNph pro 10^{10} Zellen
Adenin	100 μg	6	mit	10 5	13, 13 13, 65
Adenin	100 μg	6	ohne	10 5	13, 13 13, 13
Uracil	100 μg	6	mit	10 5	13, 65 13, 13
Uracil	100 μg	6	ohne	10 5	13, 16 13, 13
Thymin	100 μg	6	mit	10 5	14, 70 13, 65
Thymin	100 μg	6	ohne	10 5	13, 65 14, 70
Cytosin	100 μg	6	mit	10 5	11, 03 11, 55
Cytosin	100 μg	6	ohne	10 5	11, 35 11, 03
Arabinose	100 μg	6	mit	10 5	13, 65 15, 23
Arabinose	100 μg	6	ohne	10 5	13, 13 12, 60
Dextrose	100 μg	6	mit	10 5	13, 65 13, 65
Dextrose	100 μg	6	ohne	10 5	14, 18 15, 23
Saccharose	100 μg	6	mit	10 5	11, 55 12, 60

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Zahl der Passag.	Ferment- ansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl $\times 10^9$	μg pNph. pro 10^{10} Zellen
Saccharose	100 μg	6	ohne	10 5	12,08 11,02
Arab. +Adenin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	13,13 13,13
Arab. +Adenin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	13,15 13,15
Arab. +Uracil	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	15,23 17,33
Arab. +Uracil	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	13,65 15,75
Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	12,60 13,13
+ Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	13,13 12,08
Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	12,60 12,60
+ Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	12,20 12,60
Arab. +Cytosin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	11,55 11,03
Arab. +Cytosin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	11,55 11,90
Dextr. +Adenin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	13,65 13,13
Dextr. +Adenin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	13,25 14,70
Dextr. +Uracil	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	13,13 14,70
Dextr. +Uracil	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	12,60 12,60
Dextr. +Thymin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	15,75 15,23
Dextr. +Thymin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	13,65 13,13

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Zahl der Passag.	Ferment- ansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Dextr. +Cytosin	100 μg +100 μg	4	mit	10 5	13, 13 13, 13
Dextr. +Cytosin	100 μg +100 μg	4	ohne	10 5	12, 60 12, 60
Sacch. +Adenin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	13, 13 11, 55
Sacch. +Adenin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	12, 60 12, 08
Sacch. +Uracil	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	14, 18 15, 75
Sacch. +Uracil	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	14, 15 14, 17
Sacch. +Thymin	100 μg +100 μg	6	mit	10 5	18, 38 17, 33
Sacch. +Thymin	100 μg +100 μg	6	ohne	10 5	17, 33 17, 85
Sacch. +Cytosin	100 μg +100 μg	4	mit	10 5	13, 11 12, 08
Sacch. +Cytosin	100 μg +100 μg	4	ohne	10 5	13, 12 13, 13
Nährmedium		6	ohne	10 5	5, 25 6, 30

Aus Tabelle 3 ist zunächst als wesentlichstes Merkmal gegenüber den seitherigen Versuchen zu entnehmen, daß sämtliche Phosphatasewerte um ein Mehrfaches höher sind als bei Verwendung eines synthetischen und damit eines ärmeren Mediums. Da die Berechnung auf dieselbe Keimzahl bezogen wurde, handelt es sich also um eine erhöhte Phosphataseaktivität pro Zelle.

Auch hier ist im einzelnen wieder zu sagen, daß alle Werte mit Zugabe der Testsubstanzen höher sind als bei der Kontrolle. Besonders hohe Werte mit einem Anstieg auf fast das Doppelte wurden errichtet bei Verwendung von Thymin, gelegentlich auch bei Verwendung von Dextrose. Arabinose allein gab eine Steigerung von 50%.

Von den Versuchen mit einer kombinierten Anwendung von Testsubstanzen ist zu sagen, daß über das Doppelte des Kontrollwertes erreicht wurde bei Verwendung von Dextrose und Thymin, während mit Saccharose und Thymin die Werte nur etwa um 50% vermehrt waren.

Allgemein ist zu sagen, daß entsprechend der höheren Aktivität auch die Streuung der Einzelwerte bei mehrfachem Ansatz größer ist, so daß nur wesentliche Unterschiede einer Deutung zugänglich sind.

TABELLE 3

Aktivität der sauren Phosphatase von M. pyogenes var. aureus unter Verwendung von Bouillon und verschiedenen Testsubstanzen (keine Passagen)

Testsubstanz bei der Vorzüchtung	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff Testsubstanz	Konzentr.	Keim- zahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
Aqua dest.		-	-	10	40,43
				10	40,43
Adenin	100 μg	Adenin	100 μg	10	46,20
				10	45,68
Adenin	100 μg	-	-	10	45,15
				10	45,15
ohne		Adenin	100 μg	10	46,73
				10	49,35
Uracil	100 μg	Uracil	100 μg	10	51,98
				10	49,35
Uracil	100 μg	-	-	10	51,45
				10	49,35
ohne		Uracil	100 μg	10	49,35
				10	50,93
Thymin	100 μg	Thymin	100 μg	10	76,65
				10	76,65
Thymin	100 μg	-	-	10	73,50
				10	76,65
ohne		Thymin	100 μg	10	80,33
				10	78,23
Arabinose	100 μg	Arabin	100 μg	10	65,10
				10	65,10

Testsubstanz bei der Vorzüchtung	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff		Keim- zahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
		Testsubstanz	Konzentr.		
Arabinose	100 μg	-	-	10	60,90
				10	60,90
ohne		Arabin	100 μg	10	65,10
				10	69,30
Dextrose	100 μg	Dextrose	100 μg	10	77,70
				10	77,70
Dextrose	100 μg	-	-	10	73,50
				10	77,70
ohne		Dextrose	100 μg	10	80,33
				10	76,65
Saccharose	100 μg	Saccharose	100 μg	10	61,95
				10	62,00
Saccharose	100 μg	-	-	10	61,43
				10	62,48
ohne		Saccharose	100 μg	10	63,53
				10	63,53
Arab. +Adenin	je 100 μg	Arab. +Aden.	je 100 μg	10	53,55
				10	51,45
Arab. +Adenin	100 μg +100 μg	-	-	10	57,75
				10	60,90
ohne		Arab. +Aden.	je 100 μg	10	55,13
				10	55,65
Arab. +Uracil	je 100 μg	Arab. +Uracil	100 μg +100 μg	10	58,28
				10	57,23
Arab. +Uracil	100 μg +100 μg	-	-	10	57,23
				10	57,75
ohne		Arab. +Uracil	100 μg +100 μg	10	65,10
				10	64,00
Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	Arab. +Thym.	100 μg +100 μg	10	57,23
				10	55,65
Arab. +Thymin	100 μg +100 μg	-	-	10	49,35
				10	49,35
ohne		Arab. +Thym.	100 μg +100 μg	10	55,13
				10	63,00
Dextr. +Adenin	100 μg +100 μg	Dextr. +Aden.	100 μg +100 μg	10	75,70
				10	77,30

Testsubstanz bei der Vorzüchtung	Endkonz. pro ml	Fermentsatz mit oder ohne Wirkstoff		Keim- zahl $\times 10^9$	$\mu\text{g pNph}$ pro 10^{10} Zellen
		Testsubstanz	Konzentr.		
Dextr. +Adenin	100 μg +100 μg	-	-	10	69,30
				10	69,30
ohne		Dextr. +Aden.	100 μg +100 μg	10	65,10
				10	71,40
Dextr. +Uracil	100 μg +100 μg	Dextr. +Urac.	100 μg +100 μg	10	90,30
				10	94,50
Dextr. +Uracil	100 μg +100 μg	-	-	10	90,30
				10	90,30
ohne		Dextr. +Urac.	100 μg +100 μg	10	94,50
				10	91,35
Dextr. +Thymin	100 μg +100 μg	Dextr. +Thym.	100 μg +100 μg	10	94,50
				10	98,70
Dextr. +Thymin	100 μg +100 μg	-	-	10	90,30
				10	90,30
ohne		Dextr. +Thym.	100 μg +100 μg	10	96,60
				10	97,65
Sacch. +Adenin	100 μg +100 μg	Sacch. +Aden.	100 μg +100 μg	10	53,55
				10	55,13
Sacch. +Adenin	100 μg +100 μg	-	-	10	53,55
				10	55,13
ohne		Sacch. +Aden.	100 μg +100 μg	10	53,63
				10	57,23
Sacch. +Uracil	100 μg +100 μg	Sacch. +Urac.	100 μg +100 μg	10	61,95
				10	61,95
Sacch. +Uracil	100 μg +100 μg	-	-	10	61,43
				10	61,43
ohne		Sacch. +Urac.	100 μg +100 μg	10	60,38
				10	61,43
Sacch. +Thymin	100 μg +100 μg	Sacch. +Thym.	100 μg +100 μg	10	76,65
				10	81,38
Sacch. +Thymin	100 μg +100 μg	-	-	10	65,10
				10	65,10
ohne		Sacch. +Thym.	100 μg +100 μg	10	78,23
				10	94,50
ohne		Cytosin	100 μg	10	46,73
				10	48,83

Testsubstanz bei der Vorzüchtung	Endkonz. pro ml	Fermentansatz mit und ohne Wirkstoff Testsubstanz	Konzentr. x 10 ⁹	Keim- zahl 10 ⁹	µg pNph pro 10 ¹⁰ Zellen
ohne		Arab. +Cytos.	100µg+100µg	10	55, 65
				10	65, 10
ohne		Dextr. +Cytos.	100µg+100µg	10	86, 10
				10	84, 53
ohne		Sacch. +Cytos.	100µg+100µg	10	49, 35
				10	49, 35

In Tabelle 4 sind die Versuche unter den gleichen Voraussetzungen wie oben durchgeführt worden, jedoch mit dem Unterschied, daß die Keime über mehrere Passagen in Bouillon mit Zusatz von Testsubstanzen vorgezüchtet worden waren. Nennenswerte Unterschiede gegenüber den Versuchen in Tabelle 3 zeigen die Resultate nicht.

TABELLE 4

Aktivität der sauren Phosphatase von *M. pyogenes* var. *aureus* unter Verwendung von Bouillon und verschiedenen Testsubstanzen (Passagen)

Testsubstanz	Endkonz. pro ml	Zahl der Passag.	Ferment- ansatz mit und ohne Wirkstoff	Keim- zahl x 10 ⁹	µg pNph pro 10 ¹⁰ Zellen
Uracil	100 µg	5	mit	10	64, 58
				10	60, 38
Uracil	100 µg	5	ohne	10	76, 65
				10	81, 38
Thymin	100 µg	5	mit	10	76, 65
				10	76, 65
Thymin	100 µg	5	ohne	10	69, 30
				10	73, 50
Arabinose	100 µg	5	mit	10	60, 90
				10	57, 23
Arabinose	100 µg	5	ohne	10	61, 43
				10	61, 43
Saccharose	100 µg	5	mit	10	65, 83
				10	68, 25
Saccharose	100 µg	5	ohne	10	60, 90
				10	57, 23
Sacchar. + Adenin je 100 µg		5	mit	10	57, 23
				10	57, 23
Sacchar. + Adenin 100 µg + 100 µg		5	ohne	10	53, 55
				10	56, 90
Sacchar. + Uracil 100 µg + 100 µg		5	mit	10	73, 50
				10	73, 50
Sacchar. + Uracil 100 µg + 100 µg		5	ohne	10	65, 83
				10	63, 00
Sacchar. + Thymin 100 µg + 100 µg		5	mit	10	73, 50
				10	65, 83
Sacchar. + Thymin 100 µg + 100 g		5	ohne	10	76, 65
				10	79, 90

V. BEEINFLUSSUNG DES RESISTENZGRADES DURCH ZUGABE VERSCHIEDENER ZUCKER, PURINE UND PYRIMIDINE

a) Versuchsanordnung

Zur Ergänzung der Phosphataseversuche wurde untersucht, ob die oben angeführten verschiedenen Zucker, Purine und Pyrimidine einen Einfluß auf den Grad der Pc-Resistenz von *Staph. M. pyogenes var. aureus* haben. Da eine Zunahme der Pc-Resistenz verbunden ist mit einer Zunahme der Phosphataseaktivität, lag diese Frage nahe.

Für die Beantwortung dieser Frage wurden zwei Methoden angewandt. Zunächst wurden die Testkeime im Dilutionstest in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der zu testenden Substanzen gegen Pc ausgetestet. Dazu wurden 18 Std. alte bei 37° C bebrütete Bouillonkulturen der Testkeime 1 : 100 mit Bouillon verdünnt und die Testsubstanzen bis zu den in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Endkonzentrationen zugegeben. Verwandt wurden geometrische Verdünnungsstufen. Die Ablesung erfolgte nach 24 Std. Bebrütung makroskopisch durch Feststellung einer wachstumsbedingten Trübung der Teströhrchen. Dann wurden von den interessierenden Verdünnungsstufen Ausstriche auf Agar angelegt einerseits zur Kontrolle der Reinheit des eingepfachten Stammes und ferner zur Feststellung einer Bakteriostase oder Bakterizidie.

Als Teststämme dienten der Pc-empfindliche Stamm *Staph. aureus* Sg 511 (mittlere Sensibilität bei 0,04 E Pc/ml) und ein Pnase negativer *Staph. aureus* Sg XII (mittlere Sensibilität bei 62,5 E Pc/ml) und ein Pnase positiver *Staph. aureus* R₄ (mittlere Sensibilität um 2500 E Pc/ml).

Da besonders die resistenten Stämme durch Aufbewahren ihre mittlere Sensibilität ändern können und bei der hohen Pc-Konzentration im Testansatz nicht standardisierte Pc-Mengen verwandt wurden, wurde zu jeder Serie mit demselben Teststamm eine eigene Kontrolle durchgeführt, auf die die Testergebnisse bezogen wurden.

Die mit dieser Versuchsanordnung ermittelten Resultate sind in Tabelle 5 angegeben.

Eine zweite Methode wurde angewandt, um einerseits festzustellen, ob unter Einwirkung der oben genannten Testsubstanzen eine Veränderung der Relation der resistenten Varianten zu dem sensiblen Anteil der Zellpopulation des Teststammes eintritt. Als Teststamm diente für diese Versuche *M. pyogenes var. aureus* Sg 511 mit einer mittleren Sensibilität von 0,04 E Pc/ml, da dieser

Stamm sich in früheren Versuchen für die hier verwandte Methode als sehr geeignet erwiesen hat (Gillissen).

Versuchsanordnung im einzelnen zu dieser Methode:

Eine 18 Std. alte, bei 37° C bebrütete Vorkultur des Teststammes in Bouillon wurde bei etwa 600 x g unter Kühlung zentrifugiert, das Keimsediment einmal mit Bouillon gewaschen und in Bouillon resuspendiert. Nach mikroskopischer Keimzählung (3-facher Ansatz mit Auszählung von je 5 großen Quadranten und Errechnung des arithmetischen Mittels) wurde die Keimsuspension mit Bouillon auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. Es wurde absichtlich eine verhältnismäßig junge Vorkultur zur Gewinnung der Testkeime benutzt, daß die Zahl mikroskopisch gezählter Zellen fast ausschließlich aus lebenden Zellen besteht. Dies ist nur zu erwarten, solange sich die Kultur in der Phase des logarithmischen Wachstums befindet, da nach Erreichung der Maximalkonzentration die Zahl der zuwachsenden Zellen kleiner ist als die Zahl der absterbenden Keime.

Die so eingestellte Keimsuspension wurde zu gleichen Teilen mit Bouillon versetzt, die die in Tabellen 6 - 9 angezeigten Testsubstanzen enthielt. Unmittelbar nach Ansatz der Versuchsmischung sowie nach 3 Std. Bebrütung bei 37° C wurde nach entsprechender Vorverdünnung der Testansätze eine sogenannte Lebendkeimzahlbestimmung (Gesamtkeimzahl = im wesentlichen eine Bestimmung des größeren sensiblen Anteils der Population) durchgeführt, indem auf 10 Agarplatten je 0,3 ml der Vorverdünnung ausgestrichen wurden. Gleichzeitig wurde bei denselben Versuchszeiten je 0,3 ml des unverdünnten Ansatzes auf 10 Agarplatten mit 0,05 E Pc/ml ausgestrichen zur Erfassung des resistenten Anteils der Population.

Die Vorverdünnung wurde so eingestellt, daß statistisch brauchbare Koloniezahlen wuchsen, d.h. in der Größernordnung von 30 - 150 Kolonien pro Platte.

Während also der Versuchsansatz nach der mikroskopischen Keimzahlbestimmung eingestellt wurde, erfolgte die Bewertung des Plattenversuchs nach der Anzahl gewachsener Kolonien.

Obwohl diese Koloniezahl besonders bei Staph. mit ihrer Klonbildung zwangsläufig kleiner ist als der mikroskopischen Zählung entspricht, so sind die erhaltenen Werte besonders vergleichbar, da eine größere Anzahl von Platten bei jedem Test angesetzt wurden und die Durchführung der Versuche stets gleich war.

Eine weitere Serie von Versuchen wird in analoger Weise durchgeführt, jedoch

mit dem Unterschied, daß die Vorkultur des Testkeims schon dieselbe Testsubstanz in denselben Endkonzentrationen enthielt wie anschließend im eigentlichen Versuch. Aus der Verschiebung der Relation des resistenten Anteils für Gesamtkeimzahl (Koloniezahl) während der Versuchsdauer wurde die Mutationsrate $a = \text{Mutationsrate} / \text{Bakterium} / \text{Teilungszyklus}$ nach der Formel

$$a = (\log n 2) \cdot (R_2 - R_1) / (N_2 - N_1)$$

berechnet, wobei R_1 und R_2 die Zahl der resistenten Kolonien/ml zu den Zeiten 1 und 2, d.h. zur Stunde 0 und zur Stunde 3 ist und N_1 und N_2 die Gesamtzahl der Kolonien zu denselben Zeiten.

Zu dieser Rechnungsmethode ist folgendes zu sagen: Die angegebene Formel ist zwar besonders geeignet für die Bestimmung der Mutationsrate durch die Erfassung resistenter Kolonien, jedoch ist dabei weniger berücksichtigt, daß resistente und sensible Varianten eine unterschiedliche Generationszeit haben können. Eine gesicherte Möglichkeit der Erfassung einer Mutationsrate ist unter diesen Voraussetzungen nicht bekannt und wird deswegen bei entsprechender allgemeiner Versuchsanordnung unberücksichtigt gelassen.

Aus diesem Grunde wurde bei der oben beschriebenen Versuchsanordnung eine verhältnismäßig kurze Versuchszeit gewählt, bei der Verschiebungen bedingt durch eine unterschiedliche Generationszeit weniger zum Ausdruck kommen, wodurch andererseits allerdings auch nur deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen erfaßt werden konnten. Die verwandte Keimkonzentration bei der Einsaat ist hoch genug, um überhaupt resistente Varianten in genügender Anzahl für die rechnerische Auswertung erwarten zu können.

Die Auszählung der gewachsenen Kolonien erfolgte bei der Gesamtlebendkeimzahlbestimmung nach 24 Std. Bebrütung und bei der Erfassung des resistenten Anteils sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. Bebrütung. In früheren Versuchen wurde festgestellt, daß manchmal nach 24 Std. Bebrütung die Kolonienzahl für die Berechnung zu klein war, wodurch dann die nach 48 Std. Bebrütung ausgezählten Kolonien zur Beurteilung herangezogen wurden. Dies ist durchaus statthaft, wenn bei der ganzen Serie in derselben Weise verfahren wird.

Dieses Verfahren gibt die Möglichkeit, die milieubedingte Veränderung der Mutationsrate unter Einfluß der Testsubstanzen zu vergleichen.

b) Besprechung der Ergebnisse von Kapitel V

Ergebnisse der Dilutionsteste:

Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß bei Verwendung des mit R_4 bezeichneten Teststammes, also eines penicillinasepositiven Stammes, Zusätze von Arabinose in Konzentrationen zwischen 2 und 200 $\mu\text{g/ml}$ unter den vorliegenden Testbedingungen keinen Einfluß auf die mittlere Resistenz bzw. mittlere Sensibilität gegen Pc haben. Lediglich bei einer Testserie (die Versuche wurden mehrmals angesetzt) war das Ergebnis in Gegenwart von 200 $\mu\text{g/ml}$ Arabinose um eine Verdünnungsstufe besser, ein Unterschied, der besonders bei Verwendung resistenter Populationen nicht beweisend ist. In der Verwendung von Dextrose und Saccharose in Konzentrationen zwischen 2 und 200 $\mu\text{g/ml}$ konnten ebenfalls gegenüber der Kontrolle keine bezeichnenden Veränderungen der mittleren Sensibilität festgestellt werden.

Versuche mit Adenin mit den Endkonzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ wurden insgesamt 3mal angesetzt. Dabei ergab sich bei einer Serie keine nennenswerte Beeinflussung der mittleren Sensibilität, bei den zwei anderen Serien aber gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der mittleren Sensibilität bis zu drei Verdünnungsstufen. Den bei solchen Testen üblichen Pipettierfehler einbezogen, gewinnt man den Eindruck, daß eine Abhängigkeit besteht zwischen der Zunahme der mittleren Sensibilität und der Adeninkonzentration.

Bei Verwendung von Uracil mit der Endkonzentration 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ konnte gegenüber der Kontrolle keine Beeinflussung der Testergebnisse festgestellt werden.

Bei Verwendung von Thymin und Cytosin in derselben Konzentration wurde beobachtet, daß 0,2 $\mu\text{g/ml}$ bis einschließlich 20 $\mu\text{g/ml}$ die mittlere Sensibilität nicht verändern, jedoch ist das Testergebnis mit den sehr hohen Konzentrationen von 200 $\mu\text{g/ml}$ bei beiden Testsubstanzen etwa um eine Verdünnungsstufe schlechter, so daß man - wenn auch nicht in beweisender Form - den Eindruck einer erhöhten mittleren Resistenz gewinnt.

Außer den vorgenannten Einzelsubstanzen wurden Kombinationen dieser Substanzen ausgetestet. Arabinose in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mit verschiedenen Konzentrationen Adenin (2 - 200 $\mu\text{g/ml}$) ergaben bei der höchsten Adeninkonzentration eine nennenswerte Erhöhung der mittleren Sensibilität um drei Verdünnungsstufen. Bei einer Adeninkonzentration von 20 bzw. 2 $\mu\text{g/ml}$ wurde die mittlere Sensibilität nur um 1 Verdünnungsstufe verbessert. Dieses Resultat kann als bezeichnend angesehen werden, da die höchste Konzentra-

tion den besten Wert ergab und bei den oben beschriebenen Versuchen mit Adenin allein ähnliche Effekte erzielt worden sind.

Kombiniert man in gleichen Konzentrationsverhältnissen Arabinose mit Uracil, mit Thymin oder Cytosin, dann ist im Verhältnis zur Kontrollreihe nur eine geringe Verbesserung der mittleren Sensibilität zu beobachten, die unter diesen Versuchsbedingungen als nicht beweisend angesprochen werden kann.

Die Versuche mit Saccharose und Dextrose wurden mit denselben Konzentrationen angesetzt. Gegenüber der Kontrolle wurde mit Saccharose und - noch weniger ausgeprägt - mit Dextrose gegenüber der Kontrolle eine geringe Verminderung der mittleren Sensibilität beobachtet.

Adenin wurde in Konzentrationen zwischen 2 und 200 $\mu\text{g/ml}$ in doppeltem Ansatz ausgetestet. Verglichen mit der Kontrolle wurde keine Beeinflussung der mittleren Sensibilität beobachtet.

Dasselbe gilt für Versuche mit Uracil, Thymin und Cytosin in Konzentrationen zwischen 0,2 und 200 $\mu\text{g/ml}$.

Die Kombinationen von Arabinose (200 $\mu\text{g/ml}$) mit Adenin (2 - 200 $\mu\text{g/ml}$) ergaben ebenfalls keine beweisende Veränderung gegenüber der Kontrollreihe.

Bei Verwendung des penicillinsensiblen Sg 511 wurde beobachtet, daß Arabinose in Konzentrationen von 2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ (3facher Ansatz) nur bei einem Ansatz in der höchsten Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ eine Verbesserung der Sensibilität um eine Verdünnungsstufe verursachte. Bei allen anderen Versuchen entsprach die mittlere Sensibilität der in der Kontrollreihe. Da es sich bei diesem Versuch um einen besonders sensiblen Testkeim handelt, ist keine weitere Verringerung der mittleren Sensibilität der Population zu erwarten. Eher nachweisbar wären mit einem solchen Stamm Resistenzsteigerungen.

Auch mit Dextrose wurde kein besseres Resultat erzielt. Lediglich mit Saccharose in der höchsten Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ wurde eine Erhöhung der Resistenz um einen Verdünnungsfaktor gesehen. Dabei kann natürlich nicht gesagt werden, ob diese Änderung beweisend ist, da Verschiebungen der Meßdaten um einen Verdünnungsfaktor bei Testreihen verhältnismäßig häufig vorkommen.

Adenin in Konzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ wurde in 3fachem Ansatz ausgetestet. Bei zwei Ansätzen konnte im Verhältnis zur Kontrolle keine Veränderung der mittleren Sensibilität beobachtet werden und nur beim dritten Ansatz trat bei der höchsten Konzentration von 20 und 200 $\mu\text{g/ml}$ eine schein-

bare Erhöhung der mittleren Sensibilität um eine Verdünnungsstufe ein.

Cytosin und Uracil bewirkten mit denselben Konzentrationsstufen gegenüber der Kontrolle keine Veränderung der mittleren Sensibilität bzw. des Resistenzgrades. Die Austestung von Thymin ergab jedoch bei allen Konzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gegenüber der Kontrolle eine sehr geringe Verschiebung der Resistenz um eine Stufe nach oben. Es muß zunächst dahingestellt bleiben, ob dieses Testergebnis bezeichnend ist, zumal bei den recht unterschiedlichen Konzentrationen keine Stufung festzustellen war.

Die Kombinationen von Arabinose (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit Adenin (2, 20 und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ergaben beim ersten Ansatz eine Erhöhung der Sensibilität gegenüber der Kontrolle um zwei Verdünnungsstufen (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Adenin) bzw. um eine Verdünnungsstufe (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Adenin). Beim zweiten Ansatz derselben Art konnte dieses Resultat nicht mehr reproduziert werden.

TABELLE 5

Ergebnisse der Dilutionsteste

Zeichenerklärung: BSt = Bakteriotase, d.h. makroskopische Röhren-
ablesung

AA = Ausstrich auf Agar

Bo-Kontr. = Bouillonkontrolle

Verdünnungsstufen -----				1	2	3	4	5
E Pc/ml -----				5000	2500	1250	625	312.5
Testsubstanz	µg/ml	Test-						
		(Endkonz.)	stamm					
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			++	++	+++
Arabinose	200	R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			++	++	+++
Arabinose	20	R ₄	BSt	+++	+++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++			
Arabinose	2	R ₄	BSt	+++	+++	+++	+++	+++
			AA	+++				
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	+	+++	+++	+++	
Arabinose	200	R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Arabinose	20	R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	+	+++	+++	+++	
Arabinose	2	R ₄	BSt	o	o	+	++	+++
			AA	+	+	+++	+++	+++
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	++	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Arabinose	200	R ₄	BSt	o	o	++	+++	+++
			AA	+	+	+++	+++	
Arabinose	20	R ₄	BSt	++	+++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++			
Arabinose	2	R ₄	BSt	o	++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	+	+++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++			
Dextrose	200	R ₄	BSt	o	++	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm		1 5000	2 2500	3 1250	4 625	5 312.5
Dextrose	20	R ₄	BSt	o	++	++	+++	+++
			AA	++	++	+++	+++	
Dextrose	2	R ₄	BSt	++	+++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++			
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Uracil	200	R ₄	BSt	o	o	+	+++	+++
			AA	+	+++	+++	+++	
Uracil	20	R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	+	+++	+++		
Uracil	2	R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	+	++	+++		
Uracil	0.2	R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	o	<u>+</u>	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Thymin	200	R ₄	BSt	<u>+</u>	++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++	+++		
Thymin	20	R ₄	BSt	o	o	+	+	+++
			AA	+	++	+++	+++	+++
Thymin	2	R ₄	BSt	o	o	++	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Thymin	0.2	R ₄	BSt	o	o	++	+++	+++
			AA	+	++	++	+++	
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	o	<u>+</u>	+++	+++
			AA	o	+	++	+++	
Cytosin	200	R ₄	BSt	o	+	<u>+</u>	+++	+++
			AA	++	++	+++	+++	
Cytosin	20	R ₄	BSt	o	o	<u>+</u>	+++	+++
			AA	+	++	+++		
Cytosin	2	R ₄	BSt	o	o	<u>+</u>	+++	+++
			AA	o	6K	++	+++	
Cytosin	0.2	R ₄	BSt	o	o	<u>+</u>	+++	+++
			AA	o	+	++	+++	
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	++	++	+++		
Arab. +Adenin	10+200	R ₄	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	+++

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm		1 5000	2 2500	3 1250	4 625	5 312.5
Arab.+Adenin	10+20	R ₄	BSt	o	o	+	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Arab.+Adenin	10+2	R ₄	BSt	o	o	+	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	+	+++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++			
Saccharose	200	R ₄	BSt	+	++	+++	+++	+++
			AA	+++	+++	+++		
Saccharose	20	R ₄	BSt	o	++	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Saccharose	2	R ₄	BSt	+	++	+++	+++	+++
			AA	++	++	+++		
Adenin	200	R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			++	++	+++
Adenin	20	R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			+++	+++	+++
Adenin	2	R ₄	BSt	o	o	o	o	+++
			AA			++	+++	+++
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			++	++	+++
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	++	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Adenin	200	R ₄	BSt	o	o	o	+++	+++
			AA		++	++	+++	
Adenin	20	R ₄	BSt	o	o	++	o	+++
			AA	6K	+	++	+	+++
Adenin	2	R ₄	BSt	o	o	++	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Adenin	0.2	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	++	++	+++	+++	+++
Adenin	200	R ₄	BSt	o	o	o	o	++
			AA			4K	++	++
Adenin	20	R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	++	++	+++	+++	
Adenin	2	R ₄	BSt	o	o	++	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Adenin	0.2	R ₄	BSt	o	+	++	+++	+++
			AA	++	++	+++	+++	

Testsubstanz	$\mu\text{g/ml}$ (Endkonz.)	Test- stamm		1 5000	2 2500	3 1250	4 625	5 312.5
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	++	++	+++		
Arab.+Uracil	10+200	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	++	+++		
Arab.+Uracil	10+20	R ₄	BSt	o	+++	+++	+++	+++
			AA	+	+++			
Arab.+Uracil	10+2	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	++	++	+++		
Arab.+Thym.	10+200	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	+	+++		
Arab.+Thym.	10+20	R ₄	BSt	o	<u>+</u>	++	+++	+++
			AA	+	++	+++	+++	
Arab.+Thym.	10+2	R ₄	BSt	o	+++	+++	+++	+++
			AA	o	+++	+++		
Arab.+Cytos.	10+200	R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	o	+++	+++		
Arab.+Cytos.	10+20	R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	o	++	+++		
Arab.+Cytos.	10+2	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA		+	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Arab.+Adenin	200+200	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	o	++	+++		
Arab.+Adenin	200+20	R ₄	BSt	o	+	+++	+++	+++
			AA	++	+++	+++		
Arab.+Adenin	200+2	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	+++	+++		
Bo-Kontr.		R ₄	BSt	o	<u>+</u>	+++	+++	+++
			AA	++	++	+++		
Arabinose	10	R ₄	BSt	o	o	+++	+++	+++
			AA	+	++	+++		

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm	1 250	2 125	3 62,5	4 31,25	5 15,625
Bo-Kontr.		Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Arabinose	200	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Arabinose	20	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Arabinose	2	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt AA	o	o	o	o	o +
Arabinose	200	Sg XII BSt AA	o	o	o	o	o +
Arabinose	20	Sg XII BSt AA	o	o	o	o	o +
Arabinose	2	Sg XII BSt AA	o	o	o	o	o ++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt AA	o	o	o +	o ++	+
Arabinose	200	Sg XII BSt AA	o	o	o	o ++	o +
Arabinose	20	Sg XII BSt AA	o	o	o	o ++	o +
Arabinose	2	Sg XII BSt AA	o	o	o +	o ++	+
Bo-Kontr.		Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Dextrose	200	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Dextrose	20	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Dextrose	2	Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	o ++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt AA	o	o	o	o +	+
Saccharose	200	Sg XII BSt AA	o	o	o +	o +	+
Saccharose	20	Sg XII BSt AA	o	o	o +	o ++	? ++
Saccharose	2	Sg XII BSt AA	o	o	o +	o +	? ++

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm	1 250	2 125	3 62.5	4 31.25	5 15.625
Bo-Kontr.		Sg XII BSt	o	o	o	o	o
		AA				+	++
Adenin	200	Sg XII BSt	o	o	o	o	o
		AA				+	++
Adenin	20	Sg XII BSt	o	o	o	o	o
		AA				+	++
Adenin	2	Sg XII BSt	o	o	o	o	o
		AA				+	++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt	o	o	o	o	+
		AA			+	++	++
Adenin	200	Sg XII BSt	o	o	o	o	+
		AA			+	6K	++
Adenin	20	Sg XII BSt	o	o	o	o	+
		AA			+	++	++
Adenin	2	Sg XII BSt	o	o	o	o	+
		AA			+	++	+++
Adenin	0.2	Sg XII BSt	o	o	o	o	+
		AA			+	+	++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++
Uracil	200	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++
Uracil	20	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++
Uracil	2	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	+++	+++
Uracil	0.2	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++
Bo-Kontr.		Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA		+	++	++	+++
Thymin	200	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA		+	++	++	+++
Thymin	20	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA		+	++	++	+++
Thymin	2	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++
Thymin	0.2	Sg XII BSt	o	o	o	+	+++
		AA			+	++	+++

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm		1 250	2 125	3 62.5	4 31.25	5 15.625
Bo-Kontr.		Sg XII	BSt	o	o	o	o	++
			AA				++	++
Cytosin	200	Sg XII	BSt	o	o	o	o	+
			AA				+	++
Cytosin	20	Sg XII	BSt	o	o	o	o	++
			AA				+	++
Cytosin	2	Sg XII	BSt	o	o	o	o	++
			AA				+	+++
Cytosin	0.2	Sg XII	BSt	o	o	o	o	++
			AA				+	+++
Bo-Kontr.		Sg XII	BSt	o	o	o	o	++
			AA	o	o	+	+	++
Arab.+Adenin	200+200	Sg XII	BSt	o	o	o	o	+
			AA				+	++
Arab.+Adenin	200+20	Sg XII	BSt	o	o	o	o	+
			AA			+	++	++
Arab.+Adenin	200+2	Sg XII	BSt	o	o	o	o	+
			AA			+	++	++
Arab.+Adenin	200+200	Sg XII	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++
Arab.+Adenin	200+20	Sg XII	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++
Arab.+Adenin	200+2	Sg XII	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++
Bo-Kontr.		Sg XII	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm	1 0.5	2 0.25	3 0.125	4 0.06	5 0.03
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				++	++
Arabinose	200	SG 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				++	+
Arabinose	20	Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				++	+
Arabinose	2	Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				++	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	<u>+</u>
		AA				o	<u>+</u>
Arabinose	200	Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				2K	+
Arabinose	20	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA				+	+
Arabinose	2	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA				+	+
Arabinose	200	Sg 511	BSt o	o	o	o	+++
		AA			5K	++	+++
Arabinose	20	Sg 511	BSt o	o	o	o	+++
		AA			1K	++	+++
Arabinose	2	Sg 511	BSt o	o	o	o	+++
		AA			+	+	+++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	+++
		AA			6K	++	+++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA		+	1K	++	++
Dextrose	200	Sg 511	BSt o	o	o	<u>+</u>	+
		AA			o	++	++
Dextrose	20	Sg 511	BSt o	o	o	<u>+</u>	+
		AA			+	++	++
Dextrose	2	Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA			o	++	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA		+	1K	++	++
Saccharose	200	Sg 511	BSt o	o	+	+++	+++
		AA 6K		+	+++	+++	
Saccharose	20	Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA		3K	2K	++	++
Saccharose	2	Sg 511	BSt o	o	o	+	+++
		AA		o	+	++	+++

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm		1 0.5	2 0.25	3 0.125	4 0.06	5 0.03
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt	o	o	o	o	+++
			AA			6K	++	+++
Adenin	200	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA				++	++
Adenin	20	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA			o	+	++
Adenin	2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	+++
			AA				5K	+
Adenin	0.2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	++
			AA				+	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA				++	++
Adenin	200	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA	o	o	o	o	+
Adenin	20	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++
Adenin	2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA				+	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA					++
Adenin	200	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA					+
Adenin	20	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA					++
Adenin	2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA					++
Adenin	0.2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	o
			AA					++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt	o	o	o	o	+
			AA				4K	++
Uracil	200	Sg 511	BSt	o	o	o	o	+
			AA				+	++
Uracil	20	Sg 511	BSt	o	o	o	o	+
			AA				++	++
Uracil	2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	+
			AA				+	++
Uracil	0.2	Sg 511	BSt	o	o	o	o	+
			AA				+	+

Testsubstanz	µg/ml (Endkonz.)	Test- stamm	1 0,5	2 0,25	3 0,125	4 0,06	5 0,03
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA					+
Thymin	200	Sg 511	BSt o	o	o	+	+
		AA		4K	+	++	+++
Thymin	20	Sg 511	BSt o	o	o	+	+
		AA			+	++	+++
Thymin	2	Sg 511	BSt o	o	o	+	+
		AA			1K	++	++
Thymin	0.2	Sg 511	BSt o	o	o	+	+
		AA			2K	++	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA				+	++
Cytosin	200	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA			+	++	++
Cytosin	20	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA			+	++	++
Cytosin	2	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA			1K	+	++
Cytosin	0.2	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA				+	+
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA		+	1K	++	++
Arab.+Adenin	200+200	Sg 511	BSt o	o	o	o	o
		AA				++	++
Arab.+Adenin	200+20	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA			+	++	++
Arab.+Adenin	200+2	Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA			1K	2K	++
Bo-Kontr.		Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA	o	o	o	+	++
Arab.+Adenin	200+200	Sg 511	BSt o	o	o	o	+
		AA	+	+	+	++	+++
Arab.+Adenin	200+20	Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA	6K	3K	6K	+	+++
Arab.+Adenin	200+2	Sg 511	BSt o	o	o	+	++
		AA	1K	9K	+	++	++

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsanordnung zur Ermittlung der Mutationsrate sind in Tabellen 6 bis 9 wiedergegeben.

Tabelle 6 enthält sowohl die Ergebnisse der Gesamtkeimzahlbestimmung (Gesamtkolonienzahl/ml unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) als auch die Zahl resistenter Kolonien/ml, aufgeteilt nach den Werten zu Versuchsbeginn und nach den Werten gegen Ende der Versuchszeit, d. h. nach 3-stündiger Inkubation bei 37° C. Verwiesen sei darauf, daß nur bei der Auszählung der resistenten Kolonien zwei Ablesungszeiten, d. h. nach 24 und nach 48 Std. aufgeführt sind.

Im ersten Teil der Tabelle 6 sind die Werte wiedergegeben, die unter Verwendung von Arabinose mit Adenin, Uracil, Thymin und Cytosin ermittelt wurden. Dabei erfolgte die Vorzüchtung der Testkeime in gewöhnlicher Bouillon. Im zweiten Teil der Tabelle 6 finden sich die Ergebnisse der in gleicher Weise durchgeführten Versuche, jedoch nach Vorzüchtung der Testkeime in Bouillon, mit denselben Zusätzen, die nachher benutzt wurden. Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß bei Vorzüchtung in Bouillon ohne besondere Zusätze die a-Werte in folgender Weise abnehmen: Bouillon-Kontrolle > Arab./Adenin > Arab. > Arab./Cytosin > Arab./Thymin > Arab./Uracil. Die absoluten Zahlen verschieben sich bei Verwendung des 48-Std.-Wertes. Nennenswert sind die Differenzen eigentlich nicht. Auffallend ist lediglich, daß der kleinste a-Wert sowohl bei der 24- als auch bei der 48-Std.-Ablesung bei Verwendung von Arab./Uracil erreicht wurde. Wurden die Keime in Bouillon mit den Testsubstanzen vorgezüchtet, dann ergab sich bei Verwendung der 48-Std.-Ablesung folgende Reihenfolge der a-Wert-Größen: Bouillon > Arab./Cytosin > Arab./Uracil > Arab./Adenin > Arab./Thymin > Arabinose. Auch bei diesen Versuchen unterscheiden sich die a-Werte unter Berücksichtigung der Fehlergröße nicht wesentlich. Auffallend ist lediglich, daß der kleinste a-Wert mit Arabinose allein erreicht wurde.

Im Verhältnis zu den Ergebnissen der Dilutionsteste fällt insgesamt auf, daß die Resistenzbildung bei Verwendung von Arabinose und Adenin gleichzeitig nicht am geringsten ist, so daß es unwahrscheinlich ist, die bessere Hemmwirkung dieser Kombinationen von Substanzen auf eine Verringerung der Mutationsrate zurückzuführen.

In Tabelle 7 sind die entsprechenden Versuche mit Dextrose und Kombinationen mit Dextrose wiedergegeben. Wurden die Testkeime nur in Bouillon vorgezüchtet, dann war die Reihenfolge der a-Wert-Größen (24-Std.-Ablesung)

TABELLE 6

Versuche zur Bestimmung der Mutationsrate (Arabinose und Kombinationen mit Arabinose)

Zeichenerklärung: 1 = Bouillonkontrolle, 2 = Versuche mit 10 γ /ml Arabinose, 3 = 10 γ /ml Arabinose + 20 γ /ml Adenin, 4 = 10 γ /ml Arab. + 20 γ /ml Uracil, 5 = 10 γ /ml Arab. + 20 γ /ml Thymin, 6 = 10 γ /ml Arab. + 20 γ /ml Cytosin.

Ges = Gesamtkeimzahl (Koloniezahl/ml mal 10^6)

Re = Zahl resistenter Kolonien/ml

a = Mutationsrate mal 10^{-6}

24 Std. = für die Berechnung wurde die Koloniezahl der Re nach 24-stündiger Bebrütung herangezogen

48 Std. = für die Berechnung wurde die Koloniezahl der Re nach 48-stündiger Bebrütung herangezogen

Vorzüchtung der Keime in Bouillon in Abwesenheit der Testsubstanz

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	4.4					
		Re	22.8					
	3	Ges	173	191	145	252	166	150
		Re	295	204	171	158	176	162
	a		4.84	2.91	3.17	1.63	2.84	2.85
48	0	Ges	-					
		Re	4.3					
	3	Ges	-					
		Re	9	13	11	6	6.6	3.6
	a		0.083	0.14	0.19	0.02	0.04	-

Vorzüchtung der Keime in Bouillon in Anwesenheit der Testsubstanz

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	5.43	4.89	4.63	3.89	4.57	3.94
		Re	27.3	21.6	10.3	13.3	7.0	9.7
	3	Ges	145	163	111	107	128	44
		Re	5.3	5.0	6.3	4.0	3.7	4.0
	a		-	-	-	-	-	-
48	0	Ges						
		Re	57.9	40.6	41	37.3	40.3	41.6
	3	Ges						
		Re	316	149	144	164	154	93
	a		5.5	1.5	2.9	3.7	2.7	3.8

TABELLE 7

Versuchè zur Bestimmung der Mutationsrate (Dextrose und Kombinationen mit Dextrose)

Zeichenerklärung: 1 = Bouillonkontr., 2 = Versuch mit Dextrose 10g/ml, 3 = Versuche mit Dextrose 10g/ml und Adenin 20g/ml, 4 = Versuche mit Dextrose 19g/ml und Uracil 20g/ml, 5 = Versuche mit Dextrose 10g/ml und Thymin 20g/ml, 6 = Versuche mit Dextrose 10g/ml und Cytosin 20g/ml.

Die anderen Bezeichnungen entsprechen der Zeichenerklärung von Tab. 6.

Vorzüchtung der Keime in Abwesenheit der Testsubstanzen in Bouillon

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	3.84					
		Re	9.49					
	3	Ges	208	165	131	136	160	100
		Re	10.3	12.6	17.6	6.7	6.7	9.7
	a		0.012	0.067	0.19	-	-	0.005
48	0	Ges	-					
		Re	306					
	3	Ges	-					
		Re	274	216	220	165	190	159
	a		-	-	-	-	-	-

Vorzüchtung der Keime in Anwesenheit der Testsubstanzen in Bouillon

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	24.3	4.9	5.1	4.5	3.6	2.9
		Re	13	18	14	12	10	8
	3	Ges	143	145	149	180	114	114
		Re	5.7	6.3	4.7	4.7	5.7	4.7
	a		-	-	-	-	-	-
48	0	Ges	-					
		Re	60.9	37.6	67.6	44	62	44
	3	Ges	-					
		Re	315	362	364	383	336	362
	a		5.5	6.9	5.9	5.8	7.4	8.5

wie folgt: Dextr./Adenin > Dextrose > Bouillon-Kontr. > Dextr./Cytosin. Die Versuche mit Dextr./Uracil und Dextr./Thymin sind nicht berechnet. Ferner war die Berechnung der 48-Std.-Ableitung nicht möglich. Auffallend sind bei diesen a-Werten die sehr kleinen Zahlen im Dezimalbereich. Wurden die Keime dagegen in Gegenwart der Testsubstanzen vorgezüchtet, dann waren die Werte höher, unterschieden sich aber bei den einzelnen Versuchen sowohl beim 24- als auch beim 48-Std.-Wert nicht deutlich.

In Tabelle 8 sind die entsprechenden Versuche mit Saccharose bzw. Saccharose und Zusätzen wiedergegeben. Bei Vorzüchtung der Testkeime in Bouillon allein ergaben sich auch bei diesem Versuch sehr niedere a-Werte, wenn zur Berechnung das nach 24-Std.-Bebrütung aufgetretene Wachstum herangezogen wurde. Auffallend ist lediglich der besonders niedrige Wert bei der Kombination Saccharose und Cytosin. Bei diesem Versuch war der a-Wert auch dann am niedrigsten, wenn die Koloniezahlen nach 48-Std.-Bebrütung herangezogen wurden.

Wurden die Keime in Gegenwart der entsprechenden Testsubstanzen vorgezüchtet, dann unterschieden sich die a-Werte (48-Std.-Wert) bei den einzelnen Versuchsgruppen unter Berücksichtigung der Fehlerbreite nicht wesentlich.

In Tabelle 9 sind die Versuche mit Adenin, Uracil, Thymin und Cytosin wiedergegeben. Diese Versuche ergaben bei Vorzüchtung der Testkeime in Bouillon ohne besondere Zusätze die niedrigsten a-Werte beim Versuch mit Cytosin, und zwar gleichgültig, ob der 24- oder 48-Std.-Wert zur Berechnung herangezogen wurde. Wurde der Testkeim dagegen in Bouillon mit der Testsubstanz vorgezüchtet, dann waren diese Unterschiede nicht mehr so deutlich.

TABELLE 8

Versuche zur Bestimmung der Mutationsrate (Sacchar. und Kombinationen mit Sacchar.)

Zeichenerklärung: 1 = Bouillon-Kontr., 2 = Versuch mit Sacchar. 10 g/ml, 3 = Sacchar. 10 g/ml + Adenin 20 g/ml, 4 = Sacchar. 10 g/ml + Uracil 20 g/ml, 5 = Sacchar. 10 g/ml + Thymin 20 g/ml, 6 = Sacchar. 10 g/ml + Cytosin 20 g/ml.

Die restliche Bezeichnung entspricht der Zeichenerklärung von Tab. 6.

Vorzüchtung der Testkeime in Bouillon in Abwesenheit der Testsubstanzen

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	3.99					
		Re	3.33					
	3	Ges	172	225	204	241	194	212
		Re	10.3	10	14	11	6	4
	a		0.124	0.09	0.15	0.10	0.04	0.01
48	0	Ges						
		Re	15					
	3	Ges						
		Re	361	347	372	365	124	96
	a		6.17	4.5	5.3	4.4	1.7	1.2

Vorzüchtung der Testkeime in Bouillon in Gegenwart der Testsubstanzen

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5	6
24	0	Ges	3.14	3.97	4.18	3.06	4.63	3.56
		Re	3.99	6.33	3.33	4.7	5.0	5.0
	3	Ges	91	114	121	134	160	145
		Re	3.66	4.66	8.99	13.3	13.3	6.99
	a				0.14	0.166	0.16	0.042
48	0	Ges						
		Re	11.0	16	15	13	13	7
	3	Ges						
		Re	78	91	166	87	132	84
	a		2.3	2.0	2.3	1.7	2.3	1.6

TABELLE 9

Versuche zur Bestimmung der Mutationsrate (Adenin, Uracil, Thymin, Cytosin)

Zeichenerklärung: 1 = Bouillon-Kontr., 2 = Adenin 20 μ /ml, 3 = Uracil 20 μ /ml, 4 = 20 μ /ml, 5 = Cytosin 20 μ /ml.

Die restlichen Zeichen entsprechen der Zeichenerklärung von Tab. 6.

Vorzüchtung der Keime in Bouillon in Abwesenheit der Testsubstanzen

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5
24	0	Ges	3.3				
		Re	5.5				
	3	Ges	150	140	129	135	325
		Re	13	11	6	9	5
	a		0.16	0.11	0.01	0.09	0.005
48	0	Ges					
		Re	27				
	3	Ges					
		Re	136	152	129	135	108
	a		2.24	2.73	2.43	2.48	0.76

Vorzüchtung in Gegenwart der Testsubstanzen

Std.	Versuchszeit in Std.	Art der Ablesung	1	2	3	4	5
24	0	Ges	4	4	3	3	3
		Re	6	13	4	3	5
	3	Ges	121	114	77	116	116
		Re	3.99	3.66	5.33	2.66	2.99
	a						
48	0	Ges					
		Re	14	23	12	11	13
	3	Ges					
		Re	99	164	75	110	131
	a		2.17	2.19	2.57	2.62	3.13

VI. DISKUSSION

In den geschilderten Experimenten wurde versucht festzustellen, ob die Pentose Arabinose und die Hexosen Dextrose und Saccharose unter definierten Bedingungen einen Einfluß auf die Aktivität von *M. pyogenes* var. *aureus* an saurer Phosphatase haben und ob im Dilutionstest diese Substanzen bei Verwendung eines penicillinsensiblen, eines pnasebildenden und eines nicht pnasebildenden penicillinresistenten *Staphylokokkus-aureus*-Stammes die mittlere Resistenz bzw. Sensibilität dieser Stämme beeinflussen. Darüber hinaus wurde versucht, ob diese Stoffe die Mutationsrate in bezeichnender Weise veränderten. In analoger Weise wurde der Einfluß von Purinen und Pyrimidinen in verschiedener Konzentration untersucht.

Die Werte für die saure Phosphatase unter Verwendung eines Teststammes, der nur in einem synthetischen Medium vorgezüchtet worden war, waren am niedrigsten in Abwesenheit der oben genannten Testsubstanzen. Im Verhältnis zu den Versuchen mit Cytosin ergaben die mit Thymin, mit Dextrose und die mit Saccharose in höherer Konzentration wesentlich ausgeprägtere Werte. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte man mit Adenin. Kombinierte Anwendung der Testsubstanzen ergab zwar hohe Phosphatasewerte, die aber nicht größer waren als die mit den einzelnen Stoffen allein.

Die nach Vorzüchtung der Testkeime in Gegenwart der Testsubstanzen ermittelten hohen Phosphatasewerte sind nicht als stichhaltig anzusehen, da im Gegensatz zu der erstgenannten Versuchsgruppe hier im Doppelansatz mit verschiedenen Zellzahlen zum Teil größere Unterschiede im umgerechneten Endwert zu beobachten waren.

Wurden die Keime in Bouillon statt in einem synthetischen Medium mit und ohne Zusatz der Testsubstanzen vorgezüchtet, dann konnte zunächst beobachtet werden, daß die Phosphatasewerte um ein Mehrfaches höher waren als bei Verwendung des synthetischen, d.h. eines weniger komplexen Mediums, obwohl die Phosphataseaktivität auf dieselbe Keimzahl bezogen wurde.

Über den Einfluß der Testsubstanzen kann gesagt werden, daß im Gegensatz zur Kontrolle alle Versuchswerte höher lagen, gleichgültig, welche Testsubstanz benutzt wurde. Besonders deutlich war diese Erhöhung bei Verwendung von Thymin, zum Teil auch bei Verwendung von Dextrose. Eine Steigerung bis zu 50% wurde mit Dextrose festgestellt. Die kombinierte Anwendung der Testsubstanzen ergab dementsprechend besonders hohe Werte bei den Kombinationen von Dextrose bzw. Saccharose mit Thymin.

Da bei diesen Versuchen, die zum Teil im mehrfachen Ansatz durchgeführt worden sind, die Streuung z.T. ziemlich groß ist, können ohne statistische Berechnung nur wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsanordnungen als bezeichnend angesehen werden.

Wurden die Testkeime schon in Gegenwart der Testsubstanzen vorgezüchtet, dann ergaben sich etwa dieselben Verhältnisse. Bei der Erfassung der Bakterio-
stase mit dem Dilutionstest wurde als besonders auffallend festgestellt, daß die Sensibilität des penicillinasepositiven Stammes R₄ in Gegenwart von Adenin bzw. in Gegenwart von Arabinose und Adenin gleichzeitig gegenüber der Kontrolle zunahm. Alle anderen Testsubstanzen oder Kombinationen davon ergaben gelegentlich zwar gegenüber der Kontrolle geringe Abweichung in der Größenordnung von einer Verdünnungsstufe, jedoch können diese Resultate nicht als ein spezifischer Effekt bewertet werden. Nennenswerte Erhöhung der mittleren Resistenz des Teststammes konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Verwendung des penicillinsensiblen Stammes Staph. aureus Sg 511 wurde in keinem Versuch eine Zunahme der mittleren Sensibilität beobachtet, was insofern verständlich ist, als ein äußerst sensibler Stamm kaum noch eine weitere Zunahme der Sensibilität zeigt, während Resistenzzunahmen leichter zu beobachten sind. Aber auch bezeichnende Resistenz erhöhungen um mehrere Faktoren wurden nicht beobachtet.

Der penicillinasenegative, aber penicillinresistente Staph. aureus Stamm Sg XII verhielt sich ähnlich wie der penicillinsensible Stamm Sg 511 Staph. aureus.

Nach diesen Versuchen wäre zu erwarten gewesen, daß die Mutationsrate sich in Gegenwart von Adenin oder Kombinationen mit Adenin vermindert, da im Verdünnungstest der penicillinasepositive Stamm unter diesen Versuchsbedingungen eine erhöhte Sensibilität zeigte. Dies war aber nicht der Fall. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß aus technischen Gründen (Homogenität und relative Stabilität) für diese Versuche der Staph. aureus Sg 511 benutzt wurde. Dieser zeigte aber auch im Dilutionstest keine sehr deutliche Beeinflussung durch Adenin.

Die Berechnung der Mutationsraten ergab vor allen Dingen mit wenigen Ausnahmen unter Berücksichtigung der Fehlerbreite keinen nennenswerten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Auffallend war lediglich, daß die Mutationsrate durch Cytosin im Gegensatz zur Kontrolle sehr klein war (1/3), was aber aufgehoben wurde, wenn die Keime in Gegenwart dieser Substanz vorgezüchtet worden waren. Dasselbe konnte beobachtet werden bei der Kombination von Saccharose und Cytosin, und, wenn auch weniger aus-

geprägt, bei Verwendung von Dextrose und Cytosin, nicht aber bei Verwendung von Arabinose und Cytosin.

Eine Erklärung dieses Resultats aus den seitherigen Versuchen ist nicht ohne weiteres möglich.

Bei der Bestimmung der Mutationsrate ist einzuwenden, daß die Latenzphase der Wachstumskurve nicht berücksichtigt wurde, so daß die erhaltenen Werte als Absolutzahlen eher zu klein sind.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivität der sauren Phosphatase ist, bezogen auf stets die gleiche Keimzahl, größer, wenn die Zellen in einem nährstoffreichen Substrat wachsen. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen verursachte die Anwesenheit von Adenin, Thymin, Dextrose und Saccharose im synthetischen Medium eine höhere Phosphataseaktivität. Ein ähnlicher Effekt wurde auch erzielt bei Verwendung von Bouillon mit diesen Zusätzen.

Im Dilutionstest wurde festgestellt, daß die mittlere Sensibilität eines penicillinasebildenden und damit penicillinresistenten Staphylokokkenstammes in Gegenwart von Adenin größer wird. Dies war aber nicht zu beobachten bei Verwendung eines penicillinasenegativen, aber dennoch penicillinresistenten Stammes sowie des penicillinsensiblen Stammes Sg 511. Die Bestimmung der Mutationsrate ergab keinen weiteren Hinweis für diese Beobachtung.

VIII. LITERATUR

1. Alexander, H.E., Leidy, G.
J.exp.Med. 85, 329 (1947)
2. Alexander, H.E., Leidy, G.
J.exp.Med. 97, 17 (1953)
3. Dawson, M.H., Sia, R.H.P.
J.exp.Med. 54, 681 (1931)
4. Dufrenoy, J., Pratt, R. J.Bact. 56, 99 (1948)
5. Gillissen, G., Ruda, M.
Zbl Bakt.I, Abt. Orig. 171, 281 (1958)
6. Gillissen, G., Ruda, M.
Z. Hyg. 144, 401 (1958)
7. Gillissen, G. Experientia 15, 200 (1959)
8. Griffith, F. J. Hyg. 27, 113 (1928)
9. Hotchkiss, R.D. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 16,
457 (1951)
10. Markov, K., Saev, J.G.K., Klein, S., Monov, A.
Naturwiss. 18, 443 (1958)
11. Schäffer, P. Ann. Just. Pasteur 91, 192 (1956)

LEBENS LAUF

Ich, Mechthild Luise Heyn, wurde am 26.3.1926 in Mühlhausen als zweite Tochter des Pfarrers Ernst Heyn und seiner Ehefrau Lina, geb. Traumüller, geboren. 1944 bestand ich das Abitur an der Oberschule für Jungen in Sondershausen.

Nach Arbeits- und Kriegshilfsdienst besuchte ich die Krankengymnastikschule in Arnstadt/Thüringen, legte 1948 das Staatsexamen ab und arbeitete anschließend 2 1/2 Jahre in der orthopädischen Klinik in Arnstadt und 3 Jahre im Kreiskrankenhaus Rathenow/Havel als Krankengymnastin.

1954 begann ich in Mainz Medizin zu studieren, 1959 machte ich das Staatsexamen.

GESAMTHERSTELLUNG:
DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

